نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۹، ص. ۱۳۲۲-۱۳۰۹

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 6, Jan.-Feb. 2021, p. 1309-1322

مقاله پژوهشی

پیامد آلودگی هم‌زمان کادمیم و سرب بر شاخص‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک

ناهید آزادی[1]*- فایز رئیسی[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۶

چکیده

آلودگی خاک به کادمیم و سرب از جمله تنش‌های مهم و متداول رو به گسترش در محیط است که رشد و فعالیت جمعیت میکروبی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این دو فلز سمی ممکن است به‌صورت منفرد و یا هم‌زمان در خاک وجود داشته باشند. گرچه اثر منفرد آن‌ها بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک شناخته شده است، اما اثر مشترک آن‌ها بر کارکرد میکروبی هنوز مشخص نیست. از این رو، هدف پژوهش حاضر بررسی اثر برهم‌کنش کادمیم و سرب بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی در یک خاک آهکی طی ۱۲۰ روز انکوباسیون بود. آزمایش به صورت فاکتوریل (شامل دو سطح کادمیم و دو سطح سرب) در قالب طرح کاملاً تصادفی و در شرایط آزمایشگاهی اجرا شد. نتایج نشان داد که حضور هم‌زمان کادمیم و سرب موجب افزایش غلظت قابل جذب این فلزات و ضریب ویژه تنفسی در مقایسه با خاک‌های تیمار شده با حضور منفرد این فلزات گردید. همچنین حضور هم‌زمان دو فلز موجب کاهش بیشتر معدنی‌شدن کربن و نیتروژن، آمونیفیکاسیون آرژنین، سرعت نیترات‌سازی، کربن و نیتروژن زیست‌توده میکروبی، تنفس پایه، تنفس ناشی از سوبسترا و فعالیت آنزیمی (اوره‌آز، آریل سولفاتاز، فسفومنواستراز قلیایی، دهیدروژناز، کاتالاز و هیدرولیز فلوروسین دی‌استات) در مقایسه با تیمارهای با حضور منفرد کادمیم و سرب شد. بنابراین، حضور هم‌زمان دو فلز، اثرات منفی و بازدارندگی یکدیگر را بر رشد و فعالیت جمعیت میکروبی و کیفیت زیستی خاک تشدید می‌کنند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که هنگام ارزیابی خطر اکولوژیکی کادمیم و سرب در محیط‌های آلوده باید اثر متقابل آن‌ها بر جامعه خاکزیان نیز مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی هم‌زمان فلزات، فعالیت آنزیمی، فعالیت میکروبی، کارکرد میکروبی، مدل بلیس

مقدمه

آلودگی خاک سطحی به انواع فلزات سمی که عمدتاً به دلیل دخالت انسان از جمله فعالیت‌های کشاورزی (کاربرد کودهای کشاورزی، آفت‌کش‌ها و پساب‌ها) و صنعتی (استخراج و ذوب سنگ های معدنی فلزدار، افزایش خودروسازی، دفن و انباشت زباله و فاضلاب) می‌باشد، یکی از معضلات زیست‌محیطی پیش‌رو جوامع مدرن امروزی است که در سال‌های اخیر به دلیل ایجاد سمیت بالا در خاک همواره مورد توجه عموم مردم، دولت و متخصصان محیط‌زیست قرار گرفته است (۳ و ۱۸). فلزات سمی بر خلاف آلاینده‌های آلی تجزیه‌ناپذیر هستند و در خاک برای مدت طولانی‌تری باقی می‌مانند و سمیت، تجمع و زیست‌فراهمی بالای آن‌ها و ورود به زنجیره غذایی یک تهدید جدی برای امنیت غذایی و سلامت انواع موجودات زنده و محیط‌زیست می‌باشد (۳۸ و ۳۹). در خاک‌های آلوده، فلزات سمی معمولاً به‌طور هم‌زمان وجود دارند و اغلب با یکدیگر برای مکان‌های جذب رقابت می‌کنند (۲۰ و ۳۱). حضور هم‌زمان فلزات سمی تمایل این فلزات برای جذب بر سطوح ذرات معدنی و آلی خاک را کاهش می‌دهد و منجر به بروز خطرات جدی آلودگی فلزات با تمایل جذبی کم‌تر و تحرک بیشتر می‌شود (۲۳). در چنین شرایطی ریزجانداران خاک که نقش مؤثری در بسیاری از فرآیندهای مهم خاک (چرخه عناصر غذایی، تجزیه مواد آلی، تشکیل ساختمان خاک، بهبود و ارتقاء رشد گیاه و حاصلخیزی خاک) دارند (۶ و ۳۲) در معرض فلزات سمی با تحرک و سمیت شدیدتر قرار می‌گیرند و فراوانی، فعالیت و ساختار جمعیت میکروبی خاک مختل می‌شود و در نهایت عواقب اکولوژیکی زیان‌باری از جمله کاهش کیفیت خاک را به‌دنبال دارد (۳۴، ۴۷ و ۴۹). کادمیم (Cd^{2+}) و سرب (Pb^{2+}) از جمله فلزات کاملاً سمی و با تحرک بالا هستند که به دلیل منشاء مشترک (۳ و ۲۹) و سمیت شدیدی که دارند اغلب در لایه‌های سطحی خاک‌های آلوده به‌طور

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده مسئول: Email: nahidazadi93@gmail.com)
DOI: 10.22067/jsw.2020.15042.0

همزمان وجود دارند (۱۶، ۱۹، ۳۰، ۴۸ و ۴۹). نتایج حاصل از پژوهش‌های بسیاری از محققان نشان می‌دهد که آلودگی کادمیم و سرب به تنهایی (۳۴، ۳۸ و ۳۹) و یا به‌طور هم‌زمان (۱۶، ۱۹، ۳۰، ۴۸ و ۴۹) در خاک موجب کاهش فعالیت و فراوانی جمعیت میکروبی، سرعت بازچرخ عناصر، سرعت فرآیندهای بیوشیمیایی، تجزیه مواد آلی و فعالیت آنزیمی خاک می‌گردد. حضور هم‌زمان کادمیم و سرب تمایل این دو فلز برای جذب در فاز جامد خاک را کاهش می‌دهد و افزایش تحرک کادمیم و سرب منجر به خطرات جدی آلودگی فلزات با قدرت رقابت و تمایل جذبی کم‌تر برای گیرنده‌های زیستی می‌شود. بنابراین حضور هم‌زمان فلزات سمی در مقایسه با حضور انفرادی آن‌ها تأثیر منفی بیشتری بر جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیمی خاک دارد (۱۶، ۳۰، ۴۹ و ۵۰). هانگ و همکاران (۱۶) به بررسی اثر متقابل کادمیم و سرب بر فراوانی و فعالیت جمعیت میکروبی و آنزیمی در یک خاک آهکی پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که آلودگی کادمیم و سرب به تنهایی موجب کاهش فراوانی جمعیت قارچی و باکتریایی، کربن زیست‌توده میکروبی و فعالیت آنزیمی (اوره‌آز، دهیدروژناز، فلوروسین دی‌استات، اینورتاز و بتا-گلوکوزیداز) شده است. همچنین حضور هم‌زمان دو فلز در مقایسه با حضور منفرد آن‌ها موجب کاهش بیشتر این ویژگی‌های میکروبیولوژیکی شده است (۱۶). در پژوهش دیگر، زو و همکاران (۴۹) با بررسی برهم‌کنش کادمیم و سرب بر فعالیت و عملکرد جمعیت میکروبی خاک گزارش نمودند که اثر بازدارندگی حضور هم‌زمان کادمیم و سرب بر فعالیت و عملکرد جمعیت میکروبی بیشتر از مجموع اثر کادمیم و سرب به تنهایی است. این نتایج نشان می‌دهند که حضور هم‌زمان کادمیم و سرب با افزایش تحرک و قابلیت جذب این دو فلز سمی اثرات منفی و بازدارندگی یکدیگر را بر فعالیت و عملکرد جمعیت میکروبی خاک تشدید می‌کنند (۱۶، ۳۰، ۴۹ و ۵۰). بنابراین، با توجه به آلودگی روزافزون خاک به فلزات سمی بررسی و شناخت وجود یا عدم وجود برهم‌کنش بین این فلزات می‌تواند در مدیریت و حفاظت خاک به‌طور عام و سلامت ریزجانداران به‌طور خاص حائز اهمیت باشد. در اغلب بررسی‌های انجام شده تأثیر کادمیم و سرب بر شاخص‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک به‌صورت جداگانه مورد مطالعه قرار گرفته است و کمتر به برهم‌کنش یا اثر حضور هم‌زمان این دو فلز بر خاک و جمعیت میکروبی آن پرداخته شده است که نیازمند مطالعه و بررسی بیشتر در این زمینه می‌باشد. ازین‌رو، این پژوهش با هدف ارزیابی پاسخ برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک‌های آلوده به کادمیم و سرب به تنهایی و به‌صورت هم‌زمان در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. در این پژوهش فرض شد که حضور هم زمان کادمیم و سرب اثر منفی و بازدارندگی بیشتری بر شاخص‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک در مقایسه با حضور انفرادی آن-ها دارد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر حضور منفرد و هم‌زمان کادمیم و سرب بر شاخص‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو سطح آلودگی کادمیم (صفر و ۱۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم خاک با استفاده از کلرید کادمیم) و دو سطح آلودگی سرب (صفر و ۱۵۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک با استفاده از کلرید سرب) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ۳ تکرار در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. برای تهیه خاک، یک خاک آهکی در دشت شهرکرد از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری آن به مقدار مورد نیاز جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه و هوا خشک شدن، کوبیده و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و تا زمان شروع آزمایش در ظروف در بسته نگهداری گردید. قبل از اعمال تیمارها و شروع آزمایش، خاک مورد استفاده در ۳ تکرار مورد تجزیه فیزیکی و شیمیایی قرار گرفت. خاک مورد آزمایش دارای pH= ۷/۹، قابلیت هدایت الکتریکی (عصاره اشباع) ۱/۳ دسی‌زیمنس بر متر، کربن آلی ۴/۷ گرم بر کیلوگرم، نیتروژن کل خاک ۰/۳۹ گرم بر کیلوگرم، کربنات کلسیم معادل ۲۸۰ گرم بر کیلوگرم و بافت خاک به روش هیدرومتری لوم رسی بود. غلظت کادمیم و سرب کل به ترتیب ۰/۲ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت قابل‌دسترس آن‌ها پس از عصاره‌گیری با DTPA-TEA به ترتیب صفر و ۰/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.

مقادیر لازم از کلرید کادمیم و کلرید سرب جهت رسیدن به سطوح کادمیم و سرب مورد نظر توزین و به خاک اضافه و در نهایت به‌طور کامل مخلوط شد. سپس به‌منظور توزیع کامل فلزات در ماتریکس خاک و برقراری حالت شبه‌تعادل و نیز نزدیک شدن خاک های تیمار شده به شرایط آلودگی به مدت یک ماه در داخل ظروف در شرایط آزمایشگاه قرار داده شدند. طی این مدت رطوبت خاک در دامنه ۷۰-۶۰ درصد ظرفیت مزرعه و دمای معمولی محیط نگهداری شد. در نهایت با اعمال آلودگی، نمونه‌ها در دو سری تهیه گردید. در سری اول جهت اندازه‌گیری معدنی‌شدن کربن و سایر ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی در پایان انکوباسیون، ۱۵۰ گرم خاک خشک (۱۰۵ درجه سلسیوس) در جارهای پلاستیکی یک لیتری انتقال داده شد. در سری دوم به‌منظور اندازه‌گیری معدنی‌شدن نیتروژن، ۲۵۰ گرم خاک خشک تیمار شده در جارهای پلاستیکی یک لیتری توزین شد. جهت نزدیک شدن خاک‌های تیمار شده به شرایط طبیعی و برقراری تعادل نسبی و نیز فعال‌شدن مجدد[1] جامعه میکروبی، نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ روز در دمای معمولی محیط پیش انکوباسیون شدند. در پایان پیش‌انکوباسیون نمونه‌ها تا انتهای دوره

1- Reactivation

آزمایش (۱۲۰ روز) در انکوباتور و در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰–۶۰ درصد ظرفیت مزرعه نگهداری شدند. در طول مدت زمان انکوباسیون تنفس میکروبی و معدنی‌شدن نیتروژن (آمونیوم و نیترات) هر ۱۰ روز یک‌بار اندازه‌گیری شد (۲). در پایان انکوباسیون کادمیم و سرب قابل جذب (۲۱)، کربن و نیتروژن زیست‌توده میکروبی (۱۷)، آمونیفیکاسیون آرژنین (۱)، سرعت نیترات‌سازی (۱)، تنفس پایه میکروبی (۲)، تنفس ناشی از سوبسترا (۲) و آنزیم‌های اوره‌آز (۲)، آریل سولفاتاز (۴۱)، فسفومنواستراز قلیایی (۴۰)، دهیدروژناز (۴۲)، کاتالاز (۲۲) و هیدرولیز فلوروسین دی‌استات (۱۴) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها با آزمون Tukey در سطح احتمال $\alpha=۰/۰۵$ با استفاده از نرم‌افزار Minitab 18.1 انجام شد. در این پژوهش برای تعیین نوع و ماهیت اثرات متقابل (هم‌کرداری و پادکرداری) بین کادمیم و سرب از مدل مستقل بلیس[1] یا مدل جمع‌پذیری بلیس[2] استفاده شد (۵۱). از مدل جمع پذیری یا مدل مستقل بلیس برای تعیین نوع و ماهیت اثرات متقابل انواع تنش‌ها در اکولوژی خاک استفاده می‌شود (۷، ۲۳ و ۳۳). اساس و پایه‌ی نظری مدل مستقل بلیس، غیر وابستگی یا بدون اثر متقابل[3] بر مبنای تئوری احتمالات است. این بدان معنا است که دو تنش در ترکیب با یکدیگر تداخل ندارند، اما هر دو منجر به یک نتیجه مشابه می‌شوند. در این مدل چنین فرض می‌شود که دو تنش با یک مکانیسم مشابه عمل نمی‌کنند. در حقیقت، در این مدل اثرات پیش‌بینی شده (P) با اثرات مشاهده شده (O) در حضور دو عامل (در این‌جا کادمیم و سرب) مقایسه و نوع اثرات متقابل مشخص می‌شود. مدل مستقل بلیس به‌صورت زیر توصیف می‌گردد:

$$(Y_{Cd-Pb})_P = Y_{Cd} + Y_{Pb} - (Y_{Cd} \times Y_{Pb}) \qquad (۱)$$

که در آن $(Y_{Cd-Pb})_P$ اثرات پیش‌بینی شده در حضور هم‌زمان کادمیم (Cd) و سرب (Pb)، (Y_{Cd}) اثر مشاهده شده در حضور منفرد کادمیم و (Y_{Pb}) اثر مشاهده شده در حضور منفرد سرب هستند. چنانچه اثر مشاهده شده $(Y_{Cd-Pb})_O$ با اثر پیش‌بینی شده $(Y_{Cd-Pb})_P$ برابر باشد، برهم‌کنش کادمیم و سرب هم‌افزا[4] یا بدون اثر متقابل است. اگر اثر مشاهده شده بزرگ‌تر از اثر پیش‌بینی شده باشد، بین دو تنش رابطه هم‌کرداری یا سینرژیسمی[5] وجود دارد درحالی‌که اگر $(Y_{Cd-Pb})_O$ کوچک‌تر از $(Y_{Cd-Pb})_P$ باشد به این رابطه پادکرداری یا آنتاگونیسمی[6] گفته می‌شود (۵۱):

$$(Y_{Cd-Pb})_O \begin{cases} = (Y_{Cd-Pb})_P & \text{هم‌افزا} \\ > (Y_{Cd-Pb})_P & \text{هم‌کرداری} \\ < (Y_{Cd-Pb})_P & \text{پادکرداری} \end{cases} \qquad (۲)$$

پس از محاسبه اثرات مشاهده شده و پیش‌بینی شده، مقادیر حد اطمینان (Confidence interval, $CI_{95\%}$) در سطح ۵ درصد برای مقادیر مشاهده شده مطابق رابطه‌ی ۳ جهت بررسی آماری اختلاف معنی‌دار بین مقادیر مشاهده شده و پیش‌بینی شده محاسبه و مقایسه شد تا ماهیت اثر متقابل تنش‌ها با استفاده از رابطه مستقل بلیس تعیین گردد.

$$CI_{95\%} = ۴/۳۰۳\ (SE) \qquad (۳)$$

که در این رابطه ضریب ۴/۳۰۳ مقدار $t\alpha/2$ با درجه آزادی ۲ ($n_{(\text{تعداد نمونه})}=۳$) و SE خطای استاندارد می‌باشند.

نتایج و بحث

کادمیم و سرب قابل جذب

نتایج جدول ۱ نشان داد که غلظت کادمیم و سرب قابل جذب در حضور هم‌زمان دو فلز (به ترتیب ۳/۱ و ۴۵/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با حضور منفرد این فلزات (به ترتیب ۲/۸ و ۴۲/۱ کیلوگرم بر کیلوگرم) به‌طور معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) بالاتر بود. مطالعات دیگر نیز گزارش کردند که حضور هم‌زمان کادمیم و سرب در خاک‌های آلوده، به انتشار یکدیگر و ورود آن‌ها به بخش محلول خاک کمک می‌کند و به این ترتیب غلظت قابل جذب آن‌ها در مقایسه با حضور منفرد این دو فلز افزایش می‌یابد (۱۲، ۱۹ و ۴۶). همچنین نتایج نشان داد که در خاک‌های تیمار شده با حضور هم‌زمان دو فلز، کادمیم و سرب برای قرار گرفتن در مکان‌های جذب با هم رقابت می‌کنند و به دنبال این جذب رقابتی غلظت کادمیم قابل جذب (۹ درصد) بیشتر از غلظت سرب قابل جذب (۷ درصد) بود. زیرا کادمیم از جمله عناصری است که دارای تحرک بالایی می‌باشد. بنابراین، زیست‌فراهمی بالایی نسبت به سرب دارد (۱۳ و ۴۸). در هماهنگی با نتایج این پژوهش زین و همکاران (۴۸) گزارش نمودند که کادمیم و سرب اغلب به‌طور هم‌زمان در خاک وجود دارند و برای جذب بر سطوح ذرات خاک با هم رقابت می‌کنند و جذب رقابتی موجب افزایش حلالیت و تحرک کادمیم و وارد شدن این فلز در فاز محلول خاک می‌شود. در بررسی دیگر، گومز و همکاران (۱۳) پس از مطالعه جذب رقابتی فلزات سمی

1- Bliss Independence Model
2- Bliss Additivity Model
3- No interaction
4- Additive
5- Bliss synergism
6- Bliss antagonism

در خاک‌های آهکی برزیـل تـوالی $Pb^{2+} > Cr^{3+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+}$ را نشان دادند. آن‌ها همچنین بیان کردند که در شرایط رقابتی سرب، کروم و مس کاتیون‌های فلـزی هسـتند کـه بـا قـدرت بیشتری جذب سطحی می‌شوند درحالی‌که روی، کادمیم و نیکل کم‌تر جذب شده‌اند. حلالیت و تحرک فلزات سمی در خاک به ویژگی‌هـای مختلف از جمله غلظت فلـز، نـوع و ویژگـی‌هـای فلـز و نیـز عوامـل محیطی (خاک) وابسته است (۱۵ و ۴۴). ویژگی‌های خاک که حلالیت و قابلیت دسترسی فلزات سمی را کنترل می‌کنند شامل pH، پتانسیل اکسید و احیا (رداکس)، نـوع کـانی‌هـای رس، حضـور سـایر یـون‌هـا (رقابت)، مواد آلی خاک، فراوانی و حضور اکسـیدهای آهـن، منگنـز و کربنات کلسیم هستند (۳۶). عثمان (۴۳) در بررسی جذب فلزات سمی نشان داد که ترجیح بیشتر جـذب بـرای یـک فلـز (ماننـد سـرب) در مقایسه با فلزات دیگر ممکن است به یک سری عوامل از جمله ثابـت هیدرولیز بزرگ‌تر و بنابراین سهولت هیدرولیز، وزن اتمی بیشتر، شعاع یونی بیشتر و در نتیجه شعاع هیدراته کوچک‌تر و الکترونگاتیوی بیشتر نسبت داده شوند. بررسی نتایج به‌دست آمده از معادله مسـتقل بلـیس (جدول ۲) نشان داد که اثر مشترک کادمیم و سرب بر قابلیـت جـذب آن‌ها هم‌کرداری است. به‌عبارتی حضـور یـک فلـز اثـر فلـز دیگـر را تحریک نموده و غلظت قابل جـذب و سـمیت هـر دو افـزایش یافتـه است.

جدول ۱- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک

Table 1- Effects of experimental treatments on soil biochemical and microbiological properties

ویژگی Property	تیمار Treatment				آماره P برای اثرات متقابل P value for interaction term
	شاهد(C)	Cd	Pb	Cd×Pb	
کادمیم قابل جذب Cd_{ava} (mg kg^{-1})	0.01^{c} ±0.001	2.82^{b} ±0.03	0.03^{c} ±0.01	3.06^{a} ±0.01	P <0.001
سرب قابل جذب Pb_{ava} (mg kg^{-1})	1.08^{c} ±0.01	1.61^{c} ±0.02	42.11^{b} ±0.2	45.23^{a} ±0.08	P <0.001
نیتروژن زیست‌توده میکروبی MBN (mg N kg^{-1})	12.3^{a} ±0.01	9.9^{b} ±0.27	8.4^{c} ±0.13	5.7^{d} ±0.17	P <0.05
آمونیفیکاسیون آرژنین AA (mg NH_4-N kg^{-1} h^{-1})	2.04^{a}±0.03	1.22^{c}±0.06	1.44^{b}±0.05	1.06^{d}±0.02	P <0.001
آمونیاک‌سازی تجمعی CAM (mg NH_4-N kg^{-1})	8.82^{a}±0.04	5.93^{c}±0.02	6.07^{b}±0.01	5.83^{d}±0.02	P <0.001
نیترات‌سازی تجمعی CNI (mg NO_3-N kg^{-1})	35.81^{a}±0.54	23.07^{c}±0.30	24.24^{b}±0.31	21.42^{d}±0.03	P <0.001
سرعت نیترات‌سازی NR (mg NO_3-N kg^{-1} week^{-1})	27.83^{a}±0.11	23.28^{c}±0.25	25.75^{b}±0.49	19.57^{d}±0.17	P <0.05
تنفس پایه BR (mg C kg^{-1} day^{-1})	4.2^{a}±0.004	3.4^{c}±0.017	4.0^{b}±0.026	3.5^{c}±0.093	P <0.05
تنفس ناشی از سوبسترا SIR (mg C kg^{-1} day^{-1})	39.9^{a}±0.05	33.3^{b}±0.2	31.0^{c}±0.6	29.1^{d}±0.6	P <0.001
ضریب ویژه تنفسی qCO_2 (µg CO_2 mg^{-1} MBC day^{-1})	31.27^{c}±0.05	32.87^{b}±0.53	32.12^{bc}±0.37	36.31^{a}±0.35	P <0.01
اوره‌آز URE (µmol NH_4-N g^{-1} h^{-1})	2.63^{a}±0.02	2.47^{b}±0.01	2.37^{bc}±0.05	2.36^{c}±0.02	P <0.05
آریل سولفاتاز ARY (µmol PNP g^{-1} h^{-1})	3.3^{a}±0.02	2.4^{c}±0.08	3.2^{a}±0.1	2.7^{b}±0.04	P <0.01
فسفومنواستراز قلیایی ALP (µmol PNP g^{-1} h^{-1})	14.6^{a}±0.3	9.8^{c}±0.2	14.2^{a}±0.1	10.5^{b}±0.1	P <0.01
دهیدروژناز DEH (µmol TPF g^{-1} h^{-1})	0.207^{a}±0.0003	0.167^{c}±0.005	0.181^{b}±0.0001	0.148^{c}±0.001	P <0.01
فلوروسین دی‌استات FDA (µmol Fluorescein g^{-1} h^{-1})	0.199^{a}±0.002	0.163^{b}±0.001	0.161^{b}±0.001	0.142^{c}±0.001	P <0.001

در هر سطر میانگین‌های دارای حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون Tukey در سطح ۵ درصد هستند.

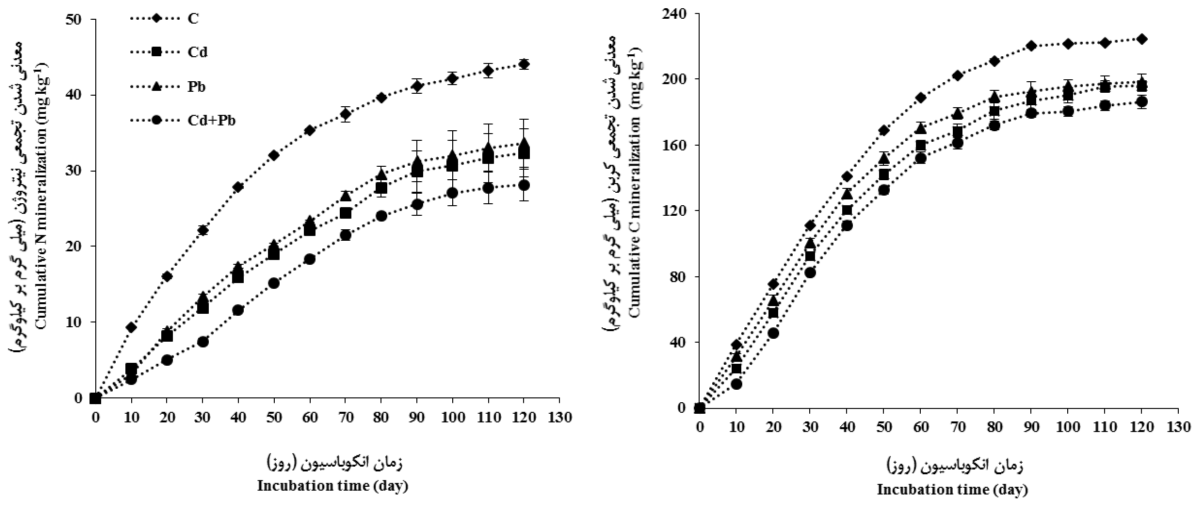
In each row the means sharing similar letters do not have significant differences by Tukey test at $P \leq 0.05$.

پاسخ ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که آلودگی کادمیم و سرب بر نیترات‌سازی تجمعی اثر معنی‌دار دارد (p<۰/۰۰۱). نتایج نشان می‌دهد که حضور منفرد و هم‌زمان کادمیم و سرب به ترتیب موجب کاهش ۳۶، ۳۲ و ۴۰ درصدی نیترات تجمعی در خاک شد (جدول ۱). همچنین نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که آلودگی کادمیم (۳۳ درصد) و سرب (۳۱ درصد) موجب کاهش آمونیاک‌سازی تجمعی و حضور هم‌زمان دو فلز به‌طور معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) سبب کاهش بیشتر (۳۴ درصد) این ویژگی در مقایسه با شاهد گردید (جدول ۱).

شکل ۱ نشان می‌دهد که کمترین میزان تجمعی معدنی‌شدن نیتروژن در خاک تیمار شده با حضور هم‌زمان کادمیم و سرب می‌باشد و بیشترین مقدار در خاک شاهد مشاهده شد. به‌طور کلی آلودگی کادمیم و سرب اثر بیشتری بر نیترات‌سازی تجمعی و در نتیجه معدنی‌شدن تجمعی نیتروژن داشت (جدول و شکل ۱). نتایج همبستگی داده‌ها (جدول ۳) نشان می‌دهد که بین نیترات‌سازی تجمعی، آمونیاک‌سازی تجمعی و معدنی‌شدن تجمعی نیتروژن خاک و غلظت کادمیم و سرب قابل جذب رابطه منفی و معنی‌دار (p<۰/۰۵) وجود دارد. رئیسی و همکاران (۳۳) پاسخ برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در خاک آلوده به کادمیم (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را بررسی و گزارش نمودند که آلودگی کادمیم موجب کاهش نیترات‌سازی تجمعی (۲۱ درصد)، آمونیاک‌سازی تجمعی (۳۹ درصد) و معدنی‌شدن تجمعی نیتروژن (۲۵ درصد) شد. فلزات سمی از طریق جانشین شدن با عناصر ضروری، غیرفعال کردن گروه‌های عامل و تغییر اشکال فعال مولکول‌های زیستی از معدنی‌شدن نیتروژن (آمونیوم و نیترات) جلوگیری می‌کنند. در واقع در شرایط تنش فلزات سمی، ریزجانداران خاک برای سازگاری با محیط به جای معدنی‌کردن نیتروژن این عنصر را جذب می‌کنند و این می‌تواند یکی از دلایل کاهش فرآیند معدنی‌شدن نیتروژن (آمونیوم و نیترات) در خاک‌های آلوده باشد (۴ و ۹).

آمونیفیکاسیون آرژنین (AA) از جمله فرآیندهای معمول و مهم چرخه نیتروژن در خاک است و شاخص بسیار خوبی جهت تعیین میزان معدنی‌شدن نیتروژن توسط ریزجانداران خاک است (۵). نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که AA با آلودگی کادمیم و سرب ارتباط معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) دارد (جدول ۱) و خاک‌های تیمار شده با حضور منفرد کادمیم و سرب به ترتیب سبب کاهش ۴۰ و ۲۹ درصدی و حضور هم‌زمان دو فلز موجب کاهش بیشتر (۴۸ درصد) AA شد. فلزات سمی با خارج نمودن بستره از دسترس ریزجانداران خاکزی و از بین بردن یا غیر فعال کردن ریزجانداران تجزیه کننده مواد آلی (۲۶، ۳۳ و ۳۵) موجب کاهش جمعیت آمونیفیکاتورها شده و در نتیجه تشکیل نیتروژن آمونیاکی از نیتروژن آلی و آمونیفیکاسیون آرژنین را کاهش می‌دهند.



شکل ۱- روند معدنی‌شدن تجمعی کربن و نیتروژن در خاک‌های تیمار شده با کادمیم ($Cd=10\ mg\ kg^{-1}$)، سرب ($Pb=150\ mg\ kg^{-1}$)، ترکیب دو فلز (Cd+Pb) و شاهد (C) (n=3)

Figure 1- The patterns of cumulative carbon (C) and nitrogen (N) mineralization in soils treated with Cd (10 mg kg^{-1}), Pb (150 mg kg^{-1}) pollution, their combination (Cd+Pb) and control (C) (n=3)

سـرعت نیتـراتسـازی (NR) نیـز یکـی دیگـر از شـاخص‌هـای میکروبی استاندارد در ارزیابی کیفیت خاک‌های آلوده به شمار مـی‌رود (۳۳). نتایج جدول ۱ نشان داد که حضور منفرد و هم‌زمـان کـادمیم و سرب موجب کـاهش (بـه ترتیـب ۱۶ ، ۷ و ۳۰ درصـد) NR گردیـد (p<۰/۰۰۱). علاوه بر این نتایج معادله مستقل بلیس نشان مـی‌دهـد که آلودگی کادمیم و سرب اثـر هـم‌کـرداری بـر NR داشـته اسـت و موجب کاهش بیشتر این ویژگی شده است (جدول ۲).

جدول ۲- ماهیت نوع اثرات متقابل کادمیم و سرب بر برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک بر اساس معادله مستقل بلیس (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود)

Table 2- The nature of the interactions of Cd and Pb pollution for soil chemical and microbiological properties on the basis of the Bliss independence model (see the text for more explanations)

ویژگی Property	تیمار Treatment					برهم‌کنش Interaction
	Cd	Pb	$(Cd\times Pb)_O$	$(Cd\times Pb)_P$	$CI_{95\%}$	
کادمیم قابل جذب Cd_{ava}	−191.7	−1.4	−208.3	−454.5	2.8	SYR*
سرب قابل جذب Pb_{ava}	−0.5	−37.9	−40.7	−57.0	0.3	SYR*
تنفس پایه BR	+0.20	+0.05	+0.18	+0.24	0.09	ANT^{ns}
ضریب ویژه تنفسی qCO_2	−0.05	−0.03	−0.16	−0.08	0.05	ANT*
تنفس ناشی از سوبسترا SIR	+0.16	+0.15	+0.30	+0.29	0.08	SYR*
کربن زیست‌توده MBC	+0.22	+0.04	+0.27	+0.25	0.07	SYR*
نیتروژن زیست‌توده MBN	+0.19	+0.32	+0.53	+0.45	0.06	SYR*
آمونیفیکاسیون آرژنین AA	+0.40	+0.29	+0.48	+0.58	0.04	ANT*
آمونیاک‌سازی تجمعی CAM	+0.33	+0.31	+0.34	+0.54	+0.01	ANT*
نیترات‌سازی تجمعی CNI	+0.36	+0.32	+0.40	+0.56	0.004	ANT*
معدنی‌شدن تجمعی نیتروژن CNM	+0.35	+0.31	+0.39	+0.55	0.01	ANT*
سرعت نیترات‌سازی NR	+0.16	+0.07	+0.29	+0.22	0.03	SYR*
فعالیت اوره‌آز URE	+0.06	+0.05	+0.11	+0.10	0.03	SYR*
فعالیت آریل سولفاتاز ARY	+0.27	+0.02	+0.16	+0.29	0.05	ANT*
فعالیت فسفومنواستراز قلیایی ALP	+0.33	−0.03	+0.28	+0.35	0.03	ANT*
فعالیت دهیدروژناز DEH	+0.19	+0.11	+0.29	+0.28	0.02	SYR*
فعالیت کاتالاز CAT	+0.04	+0.02	+0.07	+0.06	0.04	SYR^{ns}
فعالیت فلوروسین دی‌استات FDA	+0.18	+0.19	+0.28	+0.34	0.02	ANT*

Cd: آلودگی کادمیم به تنهایی، Pb: آلودگی سرب به تنهایی، $(Cd\times Pb)_O$: اثر مشترک مشاهده‌شده کادمیم و سرب، $(Cd\times Pb)_P$: اثر مشترک پیش‌بینی‌شده کادمیم و سرب، CI 95%: حدود اطمینان در سطح احتمال ۹۵ درصد، Interaction: نوع اثر متقابل، SYN: (هم‌کرداری) و ANT: (پادکرداری). ns، * به ترتیب به مفهوم غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

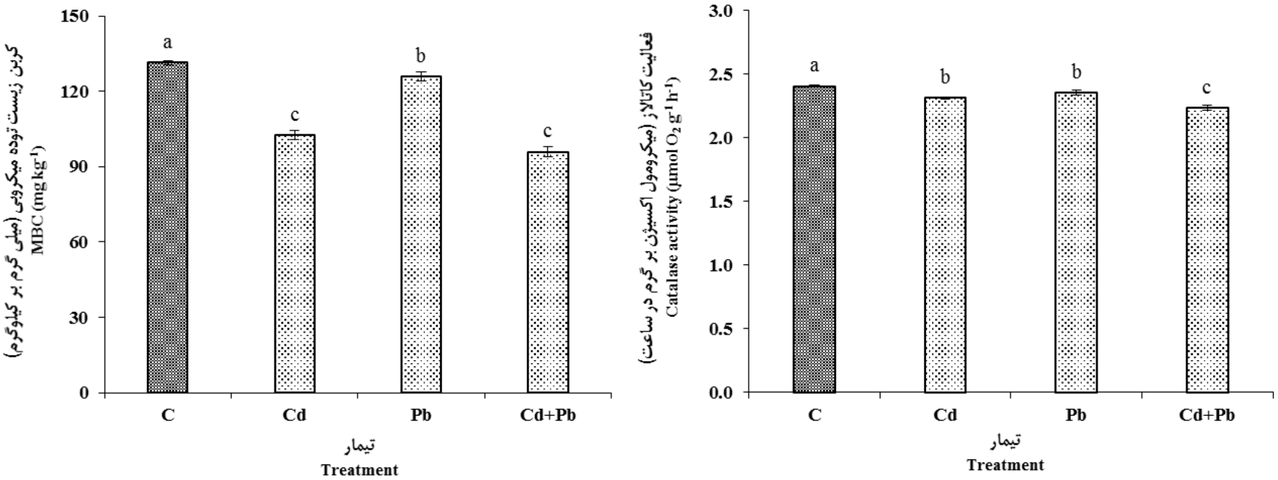
Cd: Cd-polluted soil, Pb: Pb-polluted soil, $(Cd\times Pb)_O$: the observed effect of Cd and Pb, $(Cd\times Pb)_P$: the predicted effect of Cd and Pb, $CI_{95\%}$ confidence interval at 95%; SYN synergistic, ANT antagonistic. ns, * non-significant and significant at 5 %, respectively.

باکتری‌های مسئول نیترات‌سازی در خاک از بسترەهای محدودی استفاده می‌کنند (۸). بنابراین با کاهش بستره‌ی مورد نیاز این باکتری‌ها در خاک‌های آلوده تولید آمونیوم و در نتیجه سرعت نیترات سازی در خاک کاهش می‌یابد. رئیسی و همکاران (۳۳) نشان دادند در خاک آلوده پتانسیل نیترات‌سازی کاهش می‌یابد.

معدنی‌شدن کربن آلی، تنفس پایه میکروبی (BR) و تنفس ناشی از سوبسترا (SIR) از جمله پارامترهای مهم برای پی بردن به فعالیت عمومی جمعیت میکروبی و نیز جمعیت فعال میکروبی خاک هستند و اندازه‌گیری این شاخص‌ها در تعیین بروز آلودگی‌های فلزات سمی همواره مورد توجه قرار می‌گیرد (۳۴، ۴۹ و ۵۰). نتایج این پژوهش نشان داد که میزان معدنی‌شدن کربن آلی در خاک تیمار شده با حضور هم‌زمان دو فلز همواره کمتر از تیمارهای آلوده به فلزات به تنهایی بود (شکل ۱). آلودگی کادمیم و سرب با ایجاد تنش در شرایط رشد میکروب‌های خاک موجب کاهش فعالیت و در نتیجه معدنی‌شدن کربن آلی در خاک می‌گردد. جدول ۱ نشان داد که اثر حضور هم‌زمان کادمیم و سرب بر BR و SIR معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود (جدول ۱). در خاک تیمار شده با حضور منفرد کادمیم و سرب به ترتیب ۲۱ و ۵ درصد BR در مقایسه با خاک شاهد کاهش یافت و حضور هم‌زمان دو فلز موجب کاهش (۱۸ درصد) این ویژگی شد (جدول ۱). همچنین جدول ۱ نشان داد که آلودگی کادمیم (۱۷ درصد) و سرب (۲۲ درصد) موجب کاهش SIR در مقایسه با شاهد گردید. شدت کاهش این ویژگی میکروبیولوژیکی در تیمار با حضور هم‌زمان دو فلز (۲۷ درصد) بیشتر بود. فلزات سمی با ایجاد سمیت باعث تأخیر در رشد ریزجانداران فعال می‌شوند. نتایج بسیاری از مطالعات دیگر نیز کاهش میزان معدنی‌شدن کربن (۳۴ و ۴۹)، تنفس میکروبی خاک (۳۴) و تنفس ناشی از سوبسترا (۳۴) بر اثر آلودگی کادمیم و سرب گزارش نمودند. بر اساس نتایج معادله مستقل بلیس (جدول ۲) اثر آلودگی کادمیم و سرب بر SIR هم‌کرداری (سینرژیسمی) است. این نتایج نشان می‌دهد که کادمیم و سرب اثر بازدارندگی یکدیگر را تحریک نموده و کاهش بیشتر SIR در خاک تیمار شده با حضور هم‌زمان دو فلز را موجب می‌شوند. زیست‌توده میکروبی منبع مهم عناصر غذایی قابل جذب برای گیاه در خاک است و یکی از شاخص‌های مهم سلامت خاک به شمار می‌آید. در بسیاری از مطالعات از زیست‌توده میکروبی (MBC و MBN) و ضریب ویژه تنفسی (qCO_2) به‌عنوان شاخص‌های مناسب برای ارزیابی پاسخ میکروب‌ها به تنش‌های محیطی از جمله آلودگی به فلزات سمی استفاده می‌شود (۱۶، ۳۳، ۳۴ و ۴۹). نتایج این پژوهش نشان داد که اثر حضور هم‌زمان دو فلز بر زیست‌توده میکروبی (بجز MBC) معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود (شکل ۲ و جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که آلودگی کادمیم و سرب موجب کاهش MBC و MBN و افزایش qCO_2 در مقایسه با شاهد گردید و شدت این تغییرات در خاک تیمار شده با حضور هم زمان دو فلز بیشتر بود. خاک‌های تیمار شده با حضور منفرد کادمیم به ترتیب ۲۲ و ۲۰ درصد MBC و MBN و همچنین حضور منفرد سرب به ترتیب موجب کاهش ۴ و ۳۲ درصدی MBC و MBN در مقایسه با خاک شاهد شد (شکل ۲ و جدول ۱). خاک تیمار شده با حضور هم‌زمان دو فلز سبب کاهش بیشتر (به ترتیب ۲۷ و ۵۳ درصد) MBC و MBN در مقایسه با شاهد گردید (شکل ۲ و جدول ۱). بررسی معادله مستقل بلیس نشان می‌دهد که اثر برهم‌کنش آلودگی کادمیم و سرب بر MBC و MBN هم‌کرداری (سینرژیسمی) است به‌عبارتی حضور هم‌زمان کادمیم و سرب با افزایش تحرک و قابلیت دسترسی این دو فلز سمی اثرات بازدارندگی یکدیگر را بر زیست‌توده میکروبی (MBC و MBN) تشدید می‌کنند (جدول ۲).

آلودگی کادمیم و سرب به ترتیب موجب افزایش ۵ و ۳ درصدی qCO_2 در مقایسه با خاک شاهد شد (جدول ۱). حضور هم‌زمان دو فلز افزایش بیشتر (۱۶ درصد) qCO_2 را در مقایسه با شاهد به همراه داشت (جدول ۱). نتایج همبستگی داده‌ها (جدول ۳) نشان می‌دهد که بین این ویژگی و غلظت کادمیم (r= ۰/۷۶ ،p< ۰/۰۱) و سرب (r= ۰/۵۸ ،p< ۰/۰۵) قابل جذب رابطه مثبت و معنی‌دار وجود دارد. این نتایج نشان می‌دهد که موجودات خاکزی در شرایط تنش آلودگی با فلزات سمی، کربن بیشتری را صرف تنفس می‌کنند و مقدار کمتری از آن صرف تکثیر و رشد سلولی می‌گردد.

فعالیت آنزیمی از جمله شاخص‌های بسیار مهم برای برآورد میزان فعالیت جمعیت میکروبی، کیفیت بیولوژیک خاک و ارزیابی عکس-العمل میکروب‌های خاک به تنش‌های محیطی است (۱۰ و ۴۷). نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت آنزیمی خاک به آلودگی کادمیم و سرب واکنش منفی نشان می‌دهد و شدت بازدارندگی این دو فلز سمی بستگی به شرایط آلودگی آن‌ها دارد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که برهم‌کنش کادمیم و سرب بر فعالیت آنزیمی خاک (بجز کاتالاز) معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود (جدول ۱). حضور منفرد و هم‌زمان کادمیم و سرب فعالیت اوره‌آز را به ترتیب ۶، ۱۰ و ۱۰ درصد، آریل سولفاتاز ۲۸، ۲ و ۱۶ درصد، فسفومنواستراز قلیایی ۳۳، ۳ و ۲۸ درصد، دهیدروژناز ۱۹، ۱۳ و ۲۹ درصد، کاتالاز ۴، ۲ و ۷ درصد و فلوروسین دی‌استات ۱۸، ۱۹ و ۲۸ درصد در مقایسه با خاک شاهد کاهش داد. در هماهنگی با یافته‌های این پژوهش بسیاری از محققان نیز گزارش نمودند که آلودگی منفرد کادمیم و سرب (۲۷، ۳۳ و ۳۴) و یا حضور هم‌زمان این دو فلز سمی در خاک اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیمی خاک دارند و این اثر بازدارندگی در تیمارهای با حضور هم‌زمان دو فلز در مقایسه با حضور منفرد آن‌ها شدیدتر است (۱۶، ۱۹، ۳۰ و ۵۰).



شکل ۲- تأثیر آلودگی کادمیم ($Cd=10\ mg\ kg^{-1}$)، سرب ($Pb=150\ mg\ kg^{-1}$) و ترکیب دو فلز (Cd+Pb) بر کربن آلی خاک، کربن محلول، کربن زیست‌توده میکروبی و تنفش ناشی از سوبسترا (n=3)

حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف تیمارها با شاهد (C) با آزمون Tukey در سطح ۵ درصد آماری هستند.

Figure 2- The effect of Cd (10 mg kg^{-1}), Pb (150 mg kg^{-1}) pollution and their combination (Cd+Pb) on microbial biomass carbon (MBC) and catalase (CAT) (n=3)

Different lowercase letters represent significant differences between control (C) and treatments by Tukey's test at α=0.05.

نتایج همبستگی داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که رابطه منفی بین کادمیم و سرب قابل جذب و فعالیت آنزیمی خاک وجود دارد. هر چند که اختلاف بین برخی از تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نشده است. همچنین جدول ۳ نشان می‌دهد همبستگی مثبت و معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین زیست‌توده میکروبی و فعالیت آنزیمی خاک وجود دارد. بنابراین افزایش حلالیت و غلظت قابل‌دسترس فلزات سمی و کاهش ویژگی‌های میکروبیولوژیکی در تیمارهای آلوده به کادمیم و سرب می‌تواند تا اندازه‌ای کاهش فعالیت آنزیمی در خاک‌های آلوده به فلزات سمی را توضیح دهد. فلزات سمی به‌طور مستقیم با ایجاد کمپلکس با بستره مورد نیاز آنزیم و خارج‌نمودن بستره از دسترس آن، برهم‌کنش با کمپلکس آنزیم–بستره، تغییر شکل پروتئین آنزیم و برهم‌کنش با محل فعال آنزیم اثر منفی بر فعالیت آنزیمی خاک دارند (۲۸ و ۴۵). از سوی دیگر این فلزات سمی همچنین می‌توانند با از بین بردن جمعیت میکروبی خاک و یا تغییر در فراوانی، تنوع و عملکرد جمعیت میکروبی سازنده آنزیم به‌طور غیر مستقیم فعالیت آنزیمی خاک را تحت تأثیر قرار دهند (۹، ۱۱، ۱۶ و ۲۴). ارزیابی نتایج حاصل از معادله مستقل بلیس (جدول ۳) نشان داد اثر متقابل آلودگی کادمیم و سرب بر فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، دهیدروژناز و کاتالاز هم‌کرداری (سینرژیسمی) است. نتایج به دست آمده به این معناست که حضور یک فلز اثر فلز دیگر را تحریک نموده و منجر به آلودگی خاک به فلزات سمی با تحرک و سمیت شدیدتر می‌گردد که موجب کاهش فعالیت آنزیمی خاک می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ترکیب کادمیم و سرب با هم سبب افزایش غلظت قابل جذب این فلزات می‌شود. اثر هم‌زمان کادمیم و سرب بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی اندازه گیری شده اغلب بیشتر از مجموع اثر کادمیم و سرب به تنهایی بود. بنابراین آلودگی و یا حضور هم‌زمان کادمیم و سرب در خاک‌های آلوده به صورت هم‌کرداری اثر منفی و بازدارندگی بیشتری بر جامعه میکروبی و فرآیندهای بیوشیمیایی خاک دارد. بنابراین با توجه به نقش مهم ریزجانداران در تجزیه مواد آلی، چرخه مواد غذایی و فرآیندهای تصفیه و تامپونی در محیط خاک، لزوم توجه و بررسی برهم‌کنش فلزات سمی برای کاهش اثرات بازدارندگی این فلزات بر ریزجانداران خاک و عملکرد آن‌ها در زیست‌بوم بیشتر آشکار می‌گردد. از این رو، هنگام ارزیابی خطر اکولوژیکی این فلزات در خاک‌های آلوده اثر متقابل کادمیم و سرب بر جامعه خاکزیان باید مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت‌های مالی این تحقیق قدردانی و تشکر می‌شود.

جدول ۳- ضرایب همبستگی (*r*) بین ویژگی‌های خاک (n=12)

Table 3- Correlation coefficients (*r*) between soil properties (n=12)

Property	Cd	Pb	BR	qCO_2	SIR	MBC	MBN	AA	CAM	CNI	CNM	NR	URE	ARY	ALP	DEH	CAT
Pb	0.10^{ns}																
BR	-0.95**	-0.10^{ns}															
qCO_2	0.76**	0.58*	-0.65*														
SIR	-0.54^{ns}	-0.80**	0.59*	-0.72**													
MBC	-0.97**	-0.24^{ns}	0.95**	-0.84**	0.65*												
MBN	-0.57^{ns}	-0.86**	0.55ns	-0.84**	0.94**	0.68**											
AA	-0.80**	-0.53^{ns}	0.85**	-0.75**	0.90**	0.86**	0.85**										
CAM	-0.63*	-0.58*	0.74**	-0.59*	0.92**	0.70**	0.79**	0.94**									
CNI	-0.69*	-0.59*	0.78**	-0.68*	0.93**	0.78**	0.84**	0.95**	0.99**								
CNM	-0.69*	-0.59*	0.79**	-0.67*	0.93**	0.77**	0.83**	0.96**	0.99**	0.99**							
NR	-0.89**	-0.50^{ns}	0.82**	-0.92**	0.78**	0.92**	0.85**	0.88**	0.74**	0.80**	0.80**						
URE	-0.40^{ns}	-0.79**	0.48^{ns}	-0.63*	0.89**	0.54^{ns}	0.84**	0.77**	0.86**	0.87*	0.86**	0.65*					
ARY	-0.87**	0.18^{ns}	0.90**	-0.41^{ns}	0.39^{ns}	0.80**	0.31^{ns}	0.71**	0.60*	0.62**	0.63*	0.61*	0.24^{ns}				
ALP	-0.97**	-0.10^{ns}	0.97**	-0.64*	0.51^{ns}	0.94**	0.49^{ns}	0.80**	0.66*	0.70**	0.71**	0.82**	0.39^{ns}	0.93**			
DEH	-0.87**	-0.55^{ns}	0.85**	-0.87**	0.87**	0.92**	0.89**	0.96**	0.87**	0.92**	0.92**	0.96**	0.76**	0.68*	0.83**		
CAT	-0.83**	-0.52^{ns}	0.80**	-0.91**	0.79**	0.91**	0.84**	0.86**	0.73**	0.80**	0.79**	0.91**	0.66*	0.61*	0.75**	0.92**	
FDA	-0.69*	-0.73**	0.73**	-0.80**	0.97**	0.79**	0.94**	0.95**	0.93**	0.95**	0.95**	0.88**	0.86**	0.52^{ns}	0.66*	0.95**	0.87**

ns، *، ** به ترتیب به مفهوم غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, *, ** non-significant and significant at 5 and 1%, respectively.

منابع

1. Alef K., and Kleiner D. 1987. Applicability of arginine ammonification as indicator of microbial activity in different soils. Biology and Fertility of Soils 5: 148-151.
2. Alef K., and Nannipieri P. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press, London.
3. Alloway B.J. 2013. Sources of heavy metals and metalloids in soils. In: Alloway BJ (Ed.), Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils, and their Bioavailability. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp. 11–50.
4. Amlinger F., and Boltzmann L. 1995. Biowaste compost and heavy metals: a danger for soil and environment. In: de Bertoldi P.S.M. Lemmes B. and Papi T. (eds.) Proceedings of the International Symposium on the Science of Composting. Blakie Academic and Professional. Glasgow. UK.
5. Bonde T.A., Nielsen T.H., Miller M., and Sorenson J. 2001. Arginine ammonification assay as a rapid index of gross N mineralization in agricultural soils. Biolology and Fertility of Soils 34: 179-184.
6. Bunemann E.K., Bongiorno G., Bai Z., Creamer R.E., de Deyn G., de Goede R., Fleskens L., Geissen V., Kuyper T.W., Mäder P., and Pulleman M. 2018. Soil quality–A critical review. Soil Biology and Biochemistry 120: 105-125.
7. Chaperon S., and Sauve S. 2007. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. Soil Biology and Biochemistry 39: 2329-2338.
8. Christensen B.T. 2004. Tightening the nitrogen cycle. In: Schjonning S. Elmholt S. and Christensen B.T. (eds.) Managing Soil Quality Challenges in Modern Agriculture. Oxon. UK. CABI Publishing. pp. 47-67.
9. Dai J., Becquer T., Rouiller J.H., Reversat G., Bernhard-Reversat F., and Lavelle P. 2004. Influence of heavy metals on C and N mineralization and microbial biomass in Zn-, Pb-, Cu-, and Cd-contaminated soils. Applied Soil Ecology 25: 99-109.
10. Dick R.P. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (eds) Biological indicators of soil health. CAB International, New York, pp 121–156.
11. Effron D., Horra A.M., Defrieri R.L., Fontanive V., and Palma R.M. 2004. Effect of cadmium, copper and lead on different enzyme activities in a native forest soil. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 35: 1309-1321.
12. Fan J., Cai C., Chi H., Reid B.J., Coulon F., Zhang Y., and Hou Y. 2020. Remediation of cadmium and lead polluted soil using thiol-modified biochar. Journal of Hazardous Materials 388: 122037.
13. Gomes P.C., Fontes M.P., Silva A.G., Mendonça E., and Netto A.R. 2001. Selectivity sequence and competitive adsorption of heavy metals by Brazilian soils. Soil Science Society of America Journal 65: 1115-1121.
14. Green V., Stott D., and Diack M. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. Soil Biology and Biochemistry 38: 693-701.
15. He Z.L., Yang X.E., and Stoffella P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 3: 125-140.
16. Huang S., Jia X., Zhao Y., Bai B., and Chang Y. 2017. Elevated CO_2 benefits the soil microenvironment in the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings in Cd and Pb contaminated soils. Chemosphere 168: 606-616.
17. Joergensen R.G. 1995. Microbial biomass estimation: the fumigation incubation method. In: Alef K., and Nannipieri P. (Eds). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. pp. 376–381.
18. Kabata-Pendias A., and Mukherjee A.B. 2007. Trace Elements from Soil to Human. Springer Science. Heidelberg, 550p.
19. Khan S., Hesham A.E.L., Qiao M., Rehman S., and He J.Z. 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. Environmental Science and Pollution Research 17: 288‑296.
20. Lei S., Shi Y., Qiu Y., Che L., and Xue C. 2019. Performance and mechanisms of emerging animal-derived biochars for immobilization of heavy metals. Science of the Total Environment 646: 1281-1289.
21. Lindsay W.L., and Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal 42: 421-428.
22. Liu J., Xie J., Chu Y., Sun C., Chen C., and Wang Q. 2008. Combined effect of cypermethrin and copper on catalase activity in soil. Soils and Sediments 8: 327-332.
23. Long S.M., Reichenberg F., Lister L.J., Hankard P.K., Townsend J., Mayer P., Wright J., Holmstrup M., Svendsen C., and Spurgeon D.J. 2009. Combined chemical (Fluoranthene) and drought effects on *Lumbricus rubellus* demonstrate the applicability of the independent action model for multiple stressor assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 28: 629–636.
24. Lu M., Xu K., and Chen J. 2013. Effect of pyrene and cadmium on microbial activity and community structure in soil. Chemosphere 91: 491‑497.
25. Lu S.G., and Xu Q.F. 2009. Competitive adsorption of Cd, Cu, Pb and Zn by different soils of Eastern China.

Environmental Geology 57: 685–693.

26. Luo L.Y., Xie L.L., Jin D.C., Mi B.B., Wang D.H., Li X.F., Dai X.Z., Zou X.X., Zhang Z., Ma Y.Q., and Liu F. 2019. Bacterial community response to cadmium contamination of agricultural paddy soil. Applied Soil Ecology 139: 100-106.
27. Moreno J.L., García C., and Hernández T. 2003. Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. European Journal of Soil Science 54: 377–386.
28. Nannipieri P. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution.In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds.), Soil Biota, Management in Sustainable Farming Systems. CSIRO Publications, Australia, pp.238–244.
29. Palansooriya K.N., Shaheen S.M., Chen S.S., Tsang D.C.W., Hashimoto Y., Houg D., Bolanh N.S., Rinklebeb J., and Oka Y.S. 2020. Soil amendments for immobilization of potentially toxic elements in contaminated soils: A critical review. Environment International 134: 105046.
30. Pan J., and Yu L. 2011. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. Ecological Engineering 37: 1889-1894.
31. Park J.H., Cho J.S., Ok Y.S., Kim S.H., Heo J.S., Delaune R.D., and Seo D.C. 2016. Comparison of single and competitive metal adsorption by pepper stem biochar. Archives of Agronomy and Soil Science 62: 617-632.
32. Raiesi F. 2007. The conversion of overgrazed pastures to almond orchards and alfalfa cropping system may favor microbial indicators of soil quality in central Iran. Agriculture, Ecosystems and Environment 121: 309-318.
33. Raiesi F., Razmkhah M., and Kiani S. 2018. Salinity stress accelerates the effect of cadmium toxicity on soil N dynamics and cycling: Does joint effect of these stresses matter? Ecotoxicology and Environmental Safety 153: 160-167.
34. Raiesi F., and Sadeghi E. 2019. Interactive effect of salinity and cadmium toxicity on soil microbial properties and enzyme activities. Ecotoxicology and Environmental Safety 168: 221-229.
35. Raiesi F., and Dayani L. 2020. Compost application increases the ecological dose values in a non-calcareous agricultural soil contaminated with cadmium. Ecotoxicology1-14.
36. Rieuwerts J.J., Thornton I., Farago M.E., and Ashmore M.R. 1998. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for development of a critical loads approach for metals. Chemical Speciation and Bioavailability 10: 61-75.
37. Singh B.K., Quince C., Macdonald C.A., Khachane A., Thomas N., Al-Soud W.A., Sorensen S.J., He Z., White D., Sinclair A., Crooks B., Zhou J., and Campbell C.D. 2014. Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. Environmental Microbiology 16: 2408–2420.
38. Smolders E., and Mertens J. 2013. Cadmium. In: Alloway BJ (Ed.), Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils, and their Bioavailability. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp. 283–311.
39. Steinnes E. 2013. Lead. In: In: Alloway BJ (Ed.), Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils, and their Bioavailability. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp. 395–409.
40. Tabatabai M.A., and Bremner J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology and Biochemistry 1: 301–307.
41. Tabatabai M.A., and Bremner J.M. 1970. Arylsulphatase activity of soils. Soil Science Society of America Journal 34: 225–229.
42. Thalmann A. 1966. The determination of the dehydrogenase activity in soil by means of TTC (Triphenyltetrazolium). Soil Biology and Biochemistry 6: 46-49.
43. Usman A.R.A. 2008. The relative adsorption selectivites of Pb, Cu, Zn, Cd and Ni by soils developed on shale in New Valley Egypt. Geoderma 144: 334-343.
44. Veeresh H., Tripathy S., Chaudhuri D., Hart B.R., and Powell M.A. 2003. Competitive adsorption behavior of selected heavy metals in three soil types of India amended with fly ash and sewage sludge. Environmental Geology 44: 363-370.
45. Vig K., Megharaj M., Sethunathan N., and Naidu R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. Advances in Environmental Research 8: 121-135.
46. Wang Y., Liu Y., Zhan W., Zheng K., Wang J., Zhang C., and Chen R. 2020. Stabilization of heavy metal-contaminated soils by biochar: Challenges and recommendations. Science of the Total Environment 729: 139060.
47. Wang Y.P., Shi Y.J., Wang H., Lin Q., Chen X.C., and Chen Y.X. 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. Ecotoxicology and Environmental Safety 67: 75–81.
48. Xin J.L., Huang B.F., Yang Z.Y., Yuan J.G., Dai H.W., and Qiu Q. 2010. Responses of different water spinach cultivars and their hybrid to Cd, Pb and Cd-Pb exposures. Journal of Hazardous Materials 175: 468–476.
49. Xu Y., Seshadri B., Bolan N., Sarkar B., Ok Y.S., Zhang W., Rumpel C., Sparks D., Farrell M., Hall T., and Dong Z. 2019. Microbial functional diversity and carbon use feedback in soils as affected by heavy metals. Environment International 125: 478–488.

50. Zhan J., Li T., Zhang X., Yu H., and Zhao L. 2018. Rhizosphere characteristics of phytostabilizer *Athyrium wardii* (Hook.) involved in Cd and Pb accumulation. Ecotoxicology and Environmental Safety 148: 892-900.
51. Zhao W., Sachsenmeier K., Zhang L., Sult E., Hollingsworth R.E., and Yang H. 2014. A new bliss independence model to analyze drug combination data. Journal of Biomolecular Screening 19: 817-821.

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 6, Jan.-Feb. 2021, p. 1309-1322

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۹، ص. ۱۳۲۲-۱۳۰۹

Consequences of Co-contamination of Cadmium and Lead on Soil Biochemical and Microbiological Properties

N. Azadi[1*]– F. Raiesi[2]
Received: 12-10-2020
Accepted: 16-12-2020

Introduction: Heavy metal contamination of soils is an important environmental concern, which has a long-term hazardous effect on soil biochemical and microbiological properties, including microbial and enzyme activity, microbial community structure, and the contents of organic compounds. Among heavy metals, cadmium (Cd) and lead (Pb) are two highly toxic, non-biodegradable anthropogenic pollutants that often coexist at contaminated sites. Numerous earlier studies have demonstrated a detrimental influence of Cd and Pb, both individually and jointly, on microbial and biochemical properties through the reduction of microbial activity, microbial biomass and enzyme activity in polluted soils. Metal co-contamination has a greater negative effect on soil microbial community and enzyme activity compared with individual metals. Although the individual effects of Cd and Pb on soil biological functions are generally well-known, their combined effects on microbial growth, population and functions are less well-known. The main aim of this study was to investigate the interactive effects of Cd and Pb on biochemical and microbiological properties in a contaminated soil. It was hypothesized that the combined Cd and Pb would increase the mobility and availability of Cd and Pb, which subsequently would result in further reductions in soil biochemical and microbiological properties.

Materials and Methods: The study was conducted under controlled laboratory conditions. A factorial experiment with two levels of Cd (0 and 10 mg kg^{-1}) and two levels of Pb (0 and 150 mg kg^{-1}) was conducted using a completely randomized design with three replications. The soil was artificially spiked with cadmium chloride and lead chloride solutions to attain the above concentrations. To reactivate the microbial population and for the aging effect, soil moisture was set at 70% of field capacity, and the soil samples were pre-incubated at room temperature for 20 days. Ultimately, the polluted soils were incubated under standard conditions (70% of field capacity and 25±1 ºC) for 120 days. At the end of the soil incubation, the concentration of DTPA-TEA (diethylene triamine penta acetic acid-triethanol amine)-extractable Cd and Pb, biochemical and microbiological properties including nitrification rate (NR), cumulative N mineralization (CNM), cumulative C mineralization (CCM), microbial biomass C (MBC), microbial biomass N (MBN), arginine ammonification (AA), basal respiration (BR), substrate (glucose)-induced respiration (SIR), metabolic quotient (qCO2) and the activities of soil urease (URE), alkaline phosphatase (ALP), arylsulphatase (ARY), dehydrogenase (DEH), catalase (CAT) and fluorescein diacetate hydrolysis (FDA) were determined. In this experiment, the Bliss independence model was used to determine the type and nature of the interaction between C.

Results and Discussion: Results showed that the DTPA-extractable metal (Cd and Pb) concentrations were significantly higher under the combined metals compared with the single-metals. In co-contaminated soils, a metal may contribute to the release of other metals to soil solution and consequently would enhance the availability of the released metals. Compared with individual metals, the qCO2 was greater in Cd+Pb contaminated soils. Microbial properties (MBC, MBN, AA, NR, CNM, CCM, BR, SIR) and enzyme activity (URE, ARY, ALP, DEH, CAT and FDA) significantly decreased in the presence of Cd or Pb when compared with the control. Generally, the negative effects of Cd and Pb co-pollution on biochemical and microbiological properties were higher than those of Cd or Pb alone. The results of Bliss independence model indicated a synergistic effect of Cd and Pb on microbial and biochemical functionalities in metal-co-contaminated soils.

Conclusion: Heavy metal can effectively decrease the soil biochemical and microbiological properties. This study provided strong revealing that combined Cd and Pb can increase the mobility and availability of the companion metal and this may provoke their toxicity effects on microbial community and enzyme activity in co-contaminated soils. The co-existence of Cd and Pb reduced soil biochemical and microbiological properties more than their individual presence.

1 and 2- Ph.D. Student and Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: nahidazadi93@gmail.com)
DOI: 10.22067/jsw.2020.15042.0

Therefore, considering the chemical interactions between heavy metals may improve the accuracy of the ecological risk assessment of toxic metals at multi-metal contaminated sites. However, further information on responses of microbial indicators to the joint effect of heavy metals under long-term and realistic field conditions is required.

Keywords: Bliss model, Enzymatic activity, Metal co-contamination, Microbial activity, Microbial functions